

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА**

КУРТОВА МАРІАННА МИКОЛАЇВНА

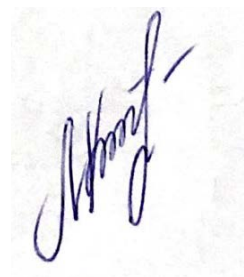
УДК 616-056.43-07-085.37

**ОПТИМІЗАЦІЯ АЛГОРИТМУ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ
АЛЕРГІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ У ПАЦІЄНТІВ З
ПОЛІСЕНСИБІЛІЗАЦІЄЮ**

14.03.08 – імунологія та алергологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the author, Marianna Mykolaivna Kurtova. The signature is stylized and written on a light-colored, slightly textured background.

Харків 2020

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України

Науковий керівник: кандидат медичних наук, доцент
Кольцова Ірина Геннадіївна,
Одеський національний медичний університет
Міністерства охорони здоров'я України,
доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Солошенко Ельвіра Миколаївна,
Державна установа «Інститут дерматології та венерології
Національної академії медичних наук України»
м. Харків,
завідувач лабораторії алергології;

доктор медичних наук, професор
Курченко Андрій Ігорович,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
Міністерства охорони здоров'я України, м. Київ,
завідувач кафедри клінічної імунології та алергології з
секцією медичної генетики.

Захист відбудеться «22» вересня 2020 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.33 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 6, ауд. 580.

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий «18» серпня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук



Т. І. Лядова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. За даними ISAAC розповсюдженість алергічного риніту (АР) коливається від 1,6% до 45,1% у різних країнах. У зв'язку з глобальною урбанізацією та підвищенням рівня життя населення вплив алергенів навколишнього середовища та різних забруднюючих речовин значно поширився (Ramasamy A., 2011; EAACI Global Atlas of Allergy, 2015). В Україні, як і в світі, алергічні захворювання становлять актуальну проблему та вимагають детального вивчення тригерних факторів розвитку алергії. Алергічні захворювання є причиною зниження працездатності дорослого населення, наприклад, у сезонні періоди цвітіння рослин. Визначення спектру пріоритетних алергенів серед рослин є необхідною умовою для раціональної діагностики та лікування алергічних захворювань.

У кожному кліматичному регіоні у пацієнтів реєструються антитіла до рослин, які розповсюджені в даній місцевості. Цей показник вивчається окремо у кожному регіоні та дозволяє лікарям звужити коло пошуків серед рослинних антигенів, що прискорює встановлення діагнозу та призначення специфічного лікування (Wenting Luo, 2016).

На етапі лабораторного обстеження лікарі зустрічаються з проблемою хибно-позитивних множинних реакцій, які не відповідають клінічним проявам, прикладом яких є антитіла до бокових карбогідратних детермінант (CCD) алергенів (Holzweber F., 2016). Вивчення впливу вуглеводних детермінант на профілі сенсibiliзації та методи боротьби з неспецифічними реакціями дозволяють лікарям визначити істинні алергени та призначати адекватну імунотерапію.

У зв'язку з тим, що специфічна імунотерапія є довготривалою та досить дорогою, дуже важливим є визначення прогностичних маркерів, які дозволять виявити істину сенсibiliзацію та виключити групи пацієнтів, для яких призначення специфічної імунотерапії є недоцільним.

Для призначення специфічної імунотерапії необхідно попереднє проведення компонентної діагностики для визначення релевантного алергену, яким буде проводитися лікування. З огляду на економічну складову, серологічні дослідження починають з екстрактної діагностики, одним із мінусів якої є проблема вищезгаданих хибно-позитивних реакцій, обумовлених антитілами до бокових карбогідратних детермінант.

Дослідження, проведене автором з метою оптимізації діагностичного алгоритму обстеження пацієнтів з алергійними захворюваннями шляхом визначення причинно-значущого алергену та виключення неспецифічних реакцій при серологічній діагностиці пацієнтів з полісенсibiliзацією, має важливе науково-практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної діяльності кафедри мікробіології, вірусології та імунології Одеського національного медичного університету «Оптимізація діагностики алергійних станів для призначення

раціональної специфічної імунотерапії» (номер держреєстрації 0115U006644). Дисертантом проведено дослідження та визначено рівень антитіл до CCD у хворих з алергічними захворюваннями та полісенсibiliзацією, проведено оцінку ефективності використання CCD-блокеру та надано рекомендації, щодо призначення молекулярної діагностики у пацієнтів з полісенсibiliзацією.

Мета і задачі дослідження. *Мета* – оптимізація алгоритму серологічної діагностики алергійних захворювань у пацієнтів з полісенсibiliзацією.

Завдання дослідження:

- 1) Виявити алергени, що найчастіше спричиняють інгаляційну та харчову алергію у пацієнтів у Південному регіоні України у різних вікових групах.
- 2) Визначити відсоток полісенсibiliзованих серед пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом.
- 3) Визначити епідеміологічні аспекти CCD-позитивності та вплив антитіл до бокових карбогідратних ланцюгів алергенів (CCD) на профілі сенсibiliзації пацієнтів із сезонним алергічним ринітом.
- 4) Вивчити ефективність використання CCD-блокерів у пацієнтів з полісенсibiliзацією для оптимізації алгоритму серологічного обстеження таких пацієнтів.
- 5) Визначити критерії необхідності призначення молекулярної діагностики на базі використання CCD-блокерів.

Об'єкт дослідження: пацієнти з сезонним алергічним ринітом та полісенсibiliзацією.

Предмет дослідження: комплекс імунологічних, серологічних та клінічних характеристик у хворих на сезонний алергічний риніт.

Методи дослідження. загальноклінічні (обстеження пацієнтів з клінічними проявами інгаляційної та харчової алергії у пацієнтів Південного регіону України), імунологічні та серологічні (вивчення спектру алергенів, рівню антитіл до перехресних вуглеводних детермінант алергенів (CCD) у пацієнтів з множинною сенсibiliзацією, визначення вмісту антитіл до мінорних та мажорних компонентів у пацієнтів з полісенсibiliзацією), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів:

Вперше на базі обстеження 4596 пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом на широкий спектр алергенів (35 респіраторних і 30 харчових) та виявлені алергени, які мають пріоритетне значення у Південному регіоні України. Так, серед алергенів рослин раннього цвітіння частіше зустрічалися антитіла до кульбаби та культивованого жита ($21,4 \pm 1,8\%$ та $16,3 \pm 0,8\%$), серед алергенів пізнього цвітіння – до амброзії полинолистої короткої ($35,7 \pm 1,7\%$) та амброзії полинолистої ($32,8 \pm 1,1\%$). Серед алергенів, які спричиняють алергію протягом року, антитіла частіше виявлялися до плісняви *Alternaria alternate* ($33,3 \pm 1,0\%$) та до кліщів *Acarus siro* ($30,6 \pm 1,3\%$). У структурі серопозитивності до харчових алергенів найчастіше реєструвалися антитіла до коров'ячого молока ($35,67 \pm 1,6\%$).

Вперше визначено частоту виявлення антитіл до CCD ($17,8 \pm 1,7\%$) у пацієнтів з сезонним алергічним ринітом та виявлено прямий кореляційний зв'язок ($r=0,88$) між кількістю позитивних реакцій на досліджувані алергени та

відсотком пацієнтів, які реагували позитивно на CCD-маркер: відсоток виявлення антитіл до CCD достовірно збільшувався у пацієнтів з 5-ма та більше маркерами на одному блоті ($p < 0,05$) і складав від $22,7 \pm 6,3\%$ у пацієнтів з 5-ма маркерами до $54,8 \pm 0,1\%$ при визначенні 10 і більше.

Вперше встановлено, що пацієнти з наявністю анти-CCD антитіл значно змінюють епідеміологічну картину сенсibilізації за рахунок підвищення проценту позитивності до рослинних та інсектних алергенів, а також латексу.

Обґрунтовано доцільність використання CCD-блокеру та виявлено найбільший відсоток блокування в розрізі груп алергенів за походженням: рослинні алергени (близько 63%), алергени інсектного походження та латекс (близько 28%).

На базі використання CCD-блокерів запропоновані критерії для подальшого призначення молекулярної діагностики.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані дозволять лікарям прицільно виявляти харчові та респіраторні алергени, які мають пріоритетне значення у Південному регіоні України та визначати ключові алергени у різних вікових групах.

На підставі отриманих епідеміологічних даних про CCD-позитивність та її вплив на профілі сенсibilізації був виготовлений лінійний CCD-блот (деклараційний патент на корисну модель №124792) для виявлення антитіл до трьох видів CCD (бромелайну, пероксидази хрому та аскорбат оксидази). Сформована тактика серологічної діагностики алергійних захворювань: пацієнти з 5-ма та більше позитивними реакціями на блоті потребують повторного обстеження з використанням CCD блокеру, що дозволить подолати проблему полісенсibilізації, яка обумовлена антитілами до бокових карбогідратних ланцюгів та оптимізувати необхідність використання молекулярної діагностики для призначення раціональної специфічної імунотерапії (інформаційний лист).

Результати роботи впроваджено у науково-дослідний процес Інституту експериментальної і клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (акт впровадження від 18.03.2019 р.), лабораторії клінічної імунології та алергології ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України" (акт впровадження від 01.09.2019 р.). Результати дослідження впроваджено в навчальний процес на кафедрі клінічної, лабораторної імунології та алергології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика (акт впровадження від 20.03.2019 р.), кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт впровадження від 01.09.2019 р.), кафедри клінічної імунології, генетики та медичної біології (акт впровадження від 01.09.2019 р.) та кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології (акт впровадження від 01.09.2019 р.) Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок дисертанта полягає у самостійному узагальненому аналізі літератури з обраної тематики та патентної інформації за темою дисертації, вибору методологічного підґрунтя започаткованого дослідження. Автором самостійно проведені серологічні

дослідження пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом, систематизація результатів та їх аналіз. Оформлення матеріалів дисертації проведені автором особисто. Сумісно з науковим керівником к.мед.н., доцентом Кольцовою І.Г. сформульовані мета і завдання роботи, окреслені предмет та завдання дослідження, обговорені наукові положення дисертації, висновки, практичні рекомендації та запатентована корисна модель (патент №124792).

Апробація результатів дисертації: Основні результати досліджень висвітлені та викладені у формі доповідей та тез на: міжнародній науково-практичній конференції «Молодь – медицини майбутнього» (Одеса, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» присвяченій 100-річчю з дня народження С.І. Корхова (Одеса, 2018); науково-практичному семінарі «Нові досягнення в діагностиці алергії та сучасний стан досліджень захворювань імунної системи» (Київ, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць, з них 6 статей (у тому числі 1 у міжнародному виданні, 5 у провідних наукових фахових виданнях, включених до переліку МОН України), 8 тез у науково-практичних конференціях, 1 інформаційний лист, та 1 патент на корисну модель.

Структура і обсяг дисертації. Робота викладена на 172 сторінках машинописного тексту, містить 18 таблиць, 39 рисунків і складається із основної частини: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, п'яти розділів результатів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій; списку використаних джерел, який налічує 205 посилань і займає 23 сторінки, та додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Упродовж 2014-2018 рр. було обстежено 4596 пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом, які вперше звернулися до лікарів алергологів Міської лікарні №5 та Німецького діагностичного центру Св. Павла м. Одеси. На першому етапі дослідження всі пацієнти заповнювали анкету, в якій враховувалися такі дані: скарги, давність захворювання, сезонність загострення, алергічні реакції на домашніх тварин та отруту жалючих комах, контактні дерматити та наявність алергічних реакцій на харчові продукти. На другому етапі дослідження з метою клінічної верифікації діагнозів алергічних захворювань, респонденти були обстежені на наявність IgE антитіл до рослинних, побутових, харчових алергенів, отрути жалючих комах та латексу методом імуноблотінгу виробництва компанії Mediwiss (Німеччина), тип блоту AlleisaScreen. За результатами даних до групи дослідження були включені 500 пацієнтів з встановленим діагнозом сезонного алергічного риніту, середнього ступеня тяжкості, які були обстежені на імуноблотах, що містили CCD-маркер – суміш бромелайну, пероксидази хрому та аскорбат оксидази – основних крос-реактивних карбогідратних ланцюгів. Серед обстежених було 275 пацієнтів чоловічої статі та 225 жіночої віком від 19 до 75 років.

Матеріалом для серологічного дослідження була сироватка крові пацієнтів, яка використовувалась у об'ємі 300 мкл. Дослідження проводилося у відповідності з інструкцією виробника методом імуноблотінгу.

До складу блотів AllergyScreen Panel 30 Resp LV, Panel 30 Mix A, Panel 30 Resp A та Panel 30 Food компанії MediWiss Analytic GmdH входили наступні маркери: рослинні – вільха, береза, дуб, ліщина, культивоване жито, полин, амброзія, суміш трав раннього цвітіння (timoфіївка, грястиця, пахуча трава звичайна) та подорожник, ромашка, кульбаба; тваринні – епітелій kota, собаки, коня, кроля, хом'яка, морської свинки, миші та пацюка; побутові – кліщі домашнього пилу (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*) та муки (*Acarus siro*), плісеньові гриби (*Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*), отрути жалючих комах (бджоли та оси), тарганів, латексу та суміш пір'я папуг; харчові – молоко, казеїн, суміш молочних сирів (Рокфор, Чедар, Ементаль, Едам), білок та жовток яєць, яловичина, суміш морепродуктів (тріска, краб, устриці), креветка, насіння кунжуту, какао, борошно пшеничне, ячне, рисове та кукурудзяне, соя, морква, картопля, томати, селера, банан, суміш цитрусових (апельсин, лайм, лимон), чорний перець, суниця, ківі, цибуля, арахіс, фундук, грецький горіх, мигдаль, фісташки.

Оцінювання результатів блотінгу було виконано за допомогою сканеру Improvio Scanner Blotrix 1C та програмного забезпечення B4C, виробництва компанії BioSciTech, Німеччина, наданими виробником тест-систем.

З метою визначення до якого конкретно CCD – маркеру (аскорбат оксидази, бромелайну або пероксидази хрону) спрямовані IgE антитіла був спеціально виготовлений лінійний CCD-блот.

84-ри пацієнти з полісенсibiliзацією (10 та більше позитивних маркерів на блоті) були повторно обстежені після абсорбції сироватки крові CCD-блокером, до складу якого входили бромелайн, пероксидаза хрону та аскорбат оксидаза, кон'юговані з альбуміном, виробництва компанії MediWiss Analytic GmdH згідно до інструкції виробника.

33-и пацієнта з 84-ьох були перевірені на наявність антитіл до екстрактів алергенів берези (t3), тимофіївки (g6) та їх рекомбінантних компонентів за допомогою молекулярних блотів виробництва компанії Euroimmun, GmdH, Німеччина. Молекулярний блот включав: екстракти алергенів берези (t3) і тимофіївки (g6); мажорні рекомбінантні компоненти берези – rBet v1 (білок PR-10), rBet v6 (ізофлавіон редуктаза); мажорні рекомбінантні компоненти тимофіївки – rPhl p1 (експансін), rPhl p 5 (рибонуклеаза); мінорні паналергени – профіліни (rBet v2, rPhl p 12), полкальціни (rBet v4, rPhl p 7).

Статистична комп'ютерна обробка результатів проведена за допомогою програмного пакета StatPlus:mac, AnalystSoft Inc. – Версія 6. (StatSoft Inc, США) та Microsoft Excel.

Для оцінки нормальності розподілу даних було використано критерій Шапіро-Уїлка, який перевіряє гіпотезу 0: «випадкова величина X розподілена нормально» і є одним з найбільш ефективних критеріїв перевірки нормальності.

При аналізі вибірок, що не підлягають законам Гаусівського розподілу, використовували U-критерій Манна-Уїтні для незалежних вибірок. U-критерій Манна-Уїтні це непараметричний статистичний критерій, що використовується для оцінки різниці між двома вибірками за рівнем будь-якої ознаки, вимірної якісно. Дозволяє виявити відмінності в значенні параметра між малими вибірками. Для оцінки ступеня взаємозв'язку між вибірками використовували коефіцієнт кореляції (r). Для оцінки значущості відмінностей між незалежними показниками використовувався критерій χ -квадрат Пірсона. Статистично значущими вважалися відмінності при $p < 0,05$ (95% рівень значущості).

Результати власних досліджень та їх обговорення. На першому етапі проведено епідеміологічне обстеження 4596 пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом на наявність антитіл до рослинних, побутових та харчових алергенів.

Серед 2194 обстежених пацієнтів на наявність антитіл до респіраторних алергенів $77,2 \pm 0,9\%$ мали антитіла принаймні до одного з присутніх на блотах. Відсотки виявлення специфічних IgE антитіл до рослинних та побутових алергенів у пацієнтів представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Відсоток виявлення специфічних IgE антитіл до рослинних та побутових алергенів у пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом в Південному регіоні України

Алерген		Кількість позитивних (абс.)	Кількість обстежених (абс.)	%±m, %
Назва	Код			
Рослинні алергени				
Вільха	t2	288	2194	13,1±0,7
Береза	t3	307	2194	14,0±0,7
Ліщина	t4	223	2194	10,2±0,7
Дуб білий	t7	92	1694	5,4±0,6
Культивоване жито	g12	358	2194	16,3±0,8
Суміш трав раннього цвітіння	Gx	321	2194	14,6±0,8
Амброзія полинолиста	w1	556	1694	32,8±1,1*
Амброзія полинолиста коротка	w2	275	770	35,7±1,7*
Кропива	w20	85	770	11,0±1,1
Ромашка	w206	85	1270	6,7±0,7
Полин гіркий	w5	92	500	18,4±1,7
Полин звичайний	w6	314	1694	18,5±0,9
Королиця	w7	175	770	22,7±1,5
Кульбаба	w8	107	500	21,4±1,8
Подорожник	w9	76	1694	4,5±0,5

Відсоток виявлення специфічних IgE антитіл до рослинних та побутових алергенів у пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом в Південному регіоні України

Алерген		Кількість позитивних (абс.)	Кількість обстежених (абс.)	%±m, %
Назва	Код			
Побутові алергени				
D. pteronyssinus	d1	518	2194	23,6±0,9
D. farinae	d2	422	2194	19,2±0,8
Acarus siro	d70	389	1270	30,6±1,3*
Тарган	i6	88	1270	6,9±0,7
Епітелій кота	e1	338	2194	15,4±0,8
Епітелій коня	e3	155	2194	7,1±0,6
Епітелій собаки	e5	262	2194	11,9±0,7
Епітелій морської свинки	e6	21	2194	1,0±0,2
Епітелій кролика	e82	15	2194	0,7±0,2

Примітки: * – $p < 0,001$ (по відношенню до всіх респіраторних алергенів).

Найбільший відсоток позитивних реакцій серед усіх обстежених пацієнтів реєструвався до амброзії полинолистій короткої ($35,7 \pm 1,7\%$), амброзії полинолистій ($32,8 \pm 1,1\%$), плісняви *Alternaria alternate* ($33,3 \pm 1,0\%$), кліщів *Acarus siro* ($30,6 \pm 1,3\%$), що було достовірно вище, ніж до усіх інших респіраторних алергенів ($p < 0,001$).

Приблизно в п'ятій частини пацієнтів були зареєстровані антитіла до кліща домашнього пилу *D. pteronyssinus* ($23,6 \pm 0,9\%$), королиці ($22,7 \pm 1,5\%$), епітелію щура ($22,4 \pm 1,8\%$) та до кульбаби ($21,4 \pm 1,8\%$). Антитіла до кліща *D. farinae*, полину звичайного, полину гіркого та до плісняви *Cladosporium herbarum* реєструвалися майже на однаковому рівні ($19,2 \pm 0,8\%$, $18,4 \pm 1,7\%$, $18,5 \pm 0,9\%$ та $17,8 \pm 0,8\%$ відповідно). Від $16,3 \pm 0,8\%$ до $10,2 \pm 0,7\%$ пацієнтів були серопозитивними до наступних алергенів: культивованого жита, епітелію пацюка та кота, суміші трав раннього цвітіння, берези, вільхи, кропиви, епітелію собаки та ліщини. Від $7,8 \pm 0,6\%$ до $4,5 \pm 0,5\%$ пацієнтів були позитивними до алергенів плісняви *Aspergillus fumigatus*, епітелію коня, таргана, ромашки, епітелію золотистого хом'яка, дубу та подорожника. Менше ніж у $3,7 \pm 0,4\%$ випадків реєструвалися антитіла до плісняви *Penicillium notatum*, суміші пір'я папуг, епітелію морської свинки та кролика.

Серед 2402 пацієнтів, які були обстежені на наявність антитіл до харчових алергенів $37,5 \pm 1,0\%$ мали антитіла хоча б до одного алергену. Відсоток виявлення IgE антитіл до харчових алергенів у пацієнтів Південного регіону України був значно менше, ніж відсоток позитивних реакцій на респіраторні алергени ($77,2 \pm 0,9\%$, $p < 0,01$). Найбільший відсоток позитивності виявлявся до алергенів коров'ячого молока ($13,7 \pm 0,7\%$), до білка яйця ($11,2 \pm 0,6\%$), міксту сирів ($10,4 \pm 0,8\%$), пшеничного та кукурудзяного борошна ($9,1 \pm 0,6\%$ та $8,7 \pm 0,7\%$) відповідно, причому антитіла до алергенів коров'ячого молока реєструвалися

достовірно частіше ніж до всіх інших харчових алергенів ($p=0,023$). Такий же розподіл алергенів за частотою зберігався у структурі серопозитивності. Так, антитіла до коров'ячого молока досягали рівня $35,7\pm 1,6\%$, до білку яйця – $29,9\pm 1,5\%$, суміш сирів – $27,1\pm 1,9\%$ пшеничного та кукурудзяного борошна – $24,5\pm 1,4\%$ та $22,5\pm 1,8\%$ відповідно. Дані представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Відсоток виявлення IgE антитіл до харчових алергенів у пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом Південного регіону України

Алерген		Кількість позитивних (абс.)	Кількість обстежених (абс.)	% $\pm m$, %
Молоко коров'яче	f2	321	2402	$13,36\pm 0,69^*$
Білок яйця	f1	269	2402	$11,20\pm 0,64$
Суміш сирів	fx400	154	1478	$10,42\pm 0,79$
Борошно пшеничне	f4	218	2402	$9,08\pm 0,59$
Борошно кукурудзяне	f8	128	1478	$8,66\pm 0,73$
Фундук	f17	175	2402	$7,29\pm 0,53$
Банан	f92	105	1478	$7,10\pm 0,67$
Арахіс	f13	165	2402	$6,87\pm 0,52$
Селера	f85	98	1478	$6,63\pm 0,65$
Казеїн	f78	93	1478	$6,29\pm 0,63$
Суміш цитрусових	fx10	92	1478	$6,22\pm 0,63$
Борошно рисове	f9	88	1478	$5,95\pm 0,62$
Морква	f31	137	2402	$5,70\pm 0,47$
Борошно ячмінне	f6	68	1478	$4,60\pm 0,54$
Картопля	f35	65	1478	$4,40\pm 0,53$
Рибна суміш	fx3	134	3326	$4,03\pm 0,34$
Томат	f25	57	1478	$3,86\pm 0,50$
Волоський горіх	f256	55	1478	$3,72\pm 0,49$
Фісташка	f203	53	1478	$3,59\pm 0,48$
Кунжут	f10	53	1478	$3,59\pm 0,48$
Ківі	f84	52	1478	$3,52\pm 0,48$
Жовток яйця	f75	52	1478	$3,52\pm 0,48$
Креветка	f24	43	1478	$2,91\pm 0,44$
Білок сої	f14pr	68	2402	$2,83\pm 0,34$
Яловичина	f27	40	1478	$2,71\pm 0,42$
Перець	f263	39	1478	$2,64\pm 0,42$
Цибуля	f48	36	1478	$2,44\pm 0,40$
Полуниця	f44	35	1478	$2,37\pm 0,40$
Какао	f93	31	1478	$2,10\pm 0,37$
Мигдаль	f20	26	1478	$1,76\pm 0,34$

Примітки: *- $p = 0,023$

З метою визначення взаємозв'язку між кількістю позитивних маркерів на блоті та CCD-позитивністю першим етапом був проаналізований відсоток виявлення різної кількості позитивних маркерів на одному блоті, тобто відсотка полісенсibilізованих пацієнтів. Було показано, що $13,4 \pm 0,73\%$ обстежених пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом не мали позитивних реакцій на блотах. У $43,0 \pm 1,06\%$ пацієнтів виявлялись від одного до 4 позитивних маркерів на блоті, а $43,6 \pm 1,06\%$ пацієнтів мали 5 та більше позитивних маркерів (рис. 1).

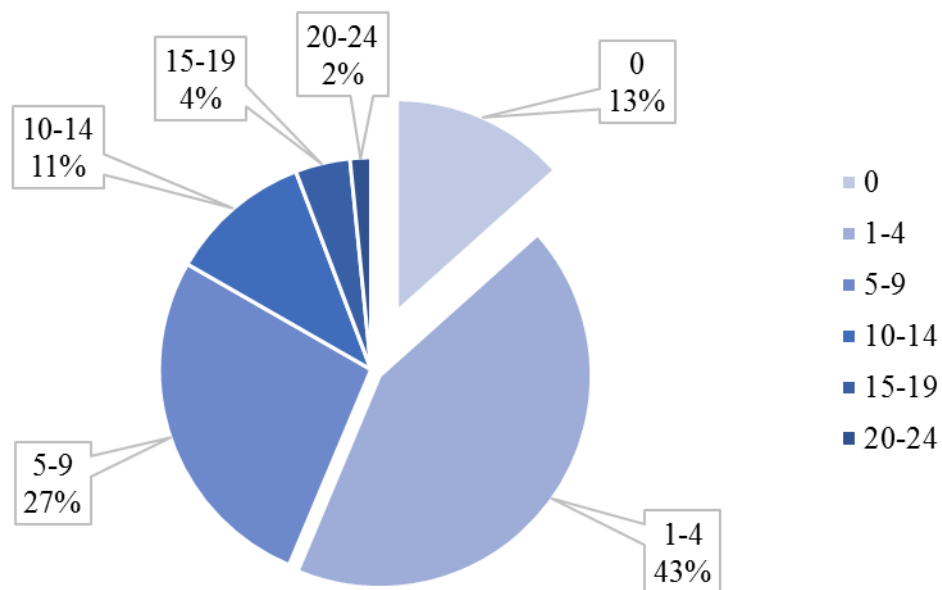


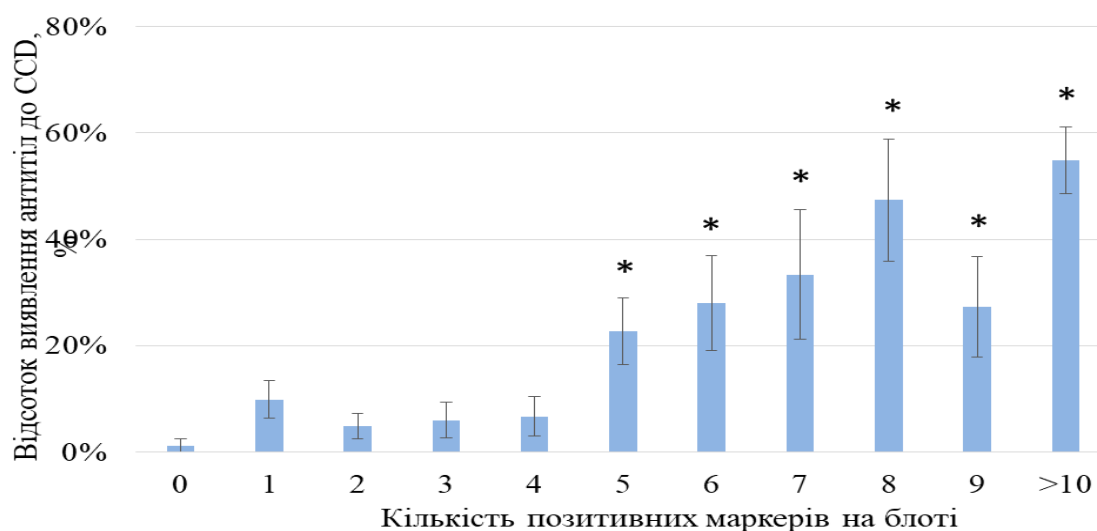
Рис. 1. Аналіз кількості маркерів на блотах

Однією з причин полісенсibilізації під час серологічної діагностики алергічних захворювань є перехресні реакції на карбогідратні ланцюги, які присутні у багатьох алергенах.

500 пацієнтів з встановленим діагнозом сезонного алергічного риніту були обстежені на наявність специфічних антитіл до респіраторних алергенів блотами AllergyScreen Panel 30 Resp LV виробництва компанії Mediawiss, Німеччина, який містив суміш CCD. Встановлено, що серед 500 обстежених пацієнтів 418 ($83,6 \pm 1,66\%$) мали антитіла хоча б до одного з алергенів, представлених на блотах. 89 пацієнтів з 418 ($17,8 \pm 1,71\%$) були позитивними по відношенню до CCD-маркеру, при чому у 88 пацієнтів реєструвалися також антитіла до різноманітних алергенів, і лише у одного пацієнта – антитіла тільки до CCD. Клас реакції до CCD складав від 1 до 6 згідно з міжнародною класифікацією RAST, де 1 клас ($0,35 - 0,69$ МО/мл) – низька концентрація sIgE, 2 клас ($0,7 - 3,49$ МО/мл) – підвищений рівень sIgE, 3 клас ($3,5 - 17,49$ МО/мл) значно підвищений рівень sIgE, 4 клас ($17,5 - 49,9$ МО/мл) – висока концентрація sIgE, 5 клас ($50,0 - 100,0$

МО/мл) – дуже висока концентрація sIgE, 6 клас (>100 МО/мл) – надзвичайно високий рівень sIgE.

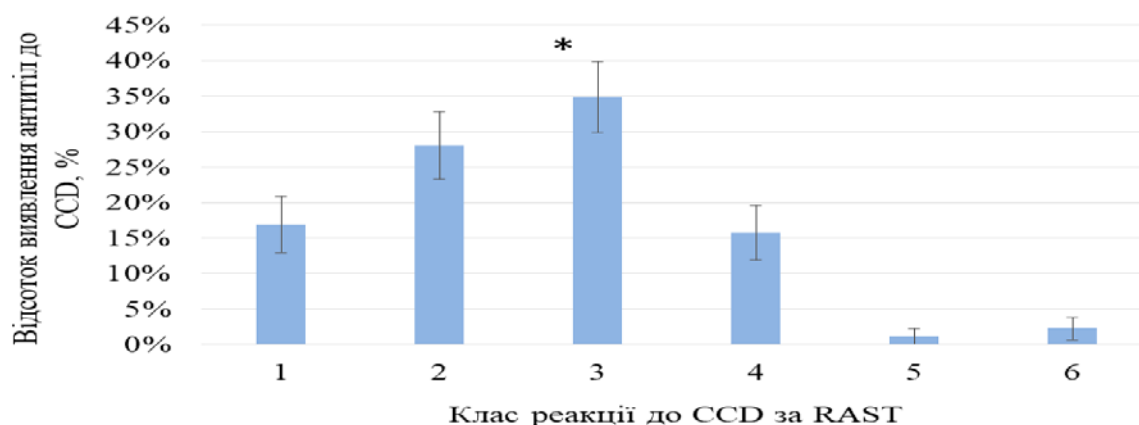
Існував кореляційний зв'язок ($r=0.88$) між кількістю позитивних реакцій на досліджувані алергени та відсотком пацієнтів, які реагували позитивно на CCD-маркер. Відсоток виявлення антитіл до CCD у пацієнтів з наявністю від одного до чотирьох маркерів на блоті або їх відсутності в середньому становив $5,70 \pm 3,1\%$ та не мав достовірних відмінностей в цих групах. Відсоток виявлення антитіл до CCD достовірно збільшувався у пацієнтів з 5-ма та більше маркерами на одному блоті ($p<0,05$) і складав від $22,72 \pm 6,31\%$ у пацієнтів з 5-ма маркерами до $54,83 \pm 0,06\%$ при визначенні 10-ти і більше (рис. 2).



Примітка: - * $p<0,05$

Рис. 2. Відсоток виявлення антитіл до CCD в залежності від кількості позитивних маркерів

Розподіл відсотку пацієнтів за класом реакції до CCD-маркеру був наступним: 1 клас – $16,9 \pm 4,0\%$; 2 клас – $28,1 \pm 4,8\%$; 3 клас – $34,8 \pm 5,1\%$; 4 клас – $15,7 \pm 3,9\%$; 5 і 6 класи реєструвалися лише у незначній кількості пацієнтів (рис.3).



Примітка: - * $p<0,01$, крім групи 2

Рис. 3. Розподіл RAST-класів до CCD серед позитивних пацієнтів

З метою визначення проти якого конкретно CCD-маркеру спрямовані IgE антитіла, а також підтвердження кореляційного зв'язку кількості позитивних реакцій на блоті та CCD-статусу пацієнтів був спеціально виготовлений лінійний блот, який містив три типи CCD: бромелайн, пероксидаза хрому та аскорбатоксидаза (деклараційний патент на корисну модель u 2017 10413). Було сформовано дві групи пацієнтів: перша група (1 група) – 34 пацієнта з підтвердженою наявністю антитіл до сумарного CCD-маркеру та кількістю специфічних позитивних алергенів на блоті 10 і більше; друга група (2 група) – 38 пацієнтів з множинними реакціями на алергени (до 14-16 позитивних смужок на блоті, див. рис. 4), які були обстежені іншими тест-системами того ж виробника (AlleisaScreen Panel 30 Resp A, Panel 30 Mix A, Panel 30 Food IR), але на яких відсутній CCD-маркер.

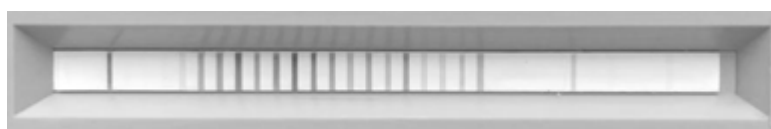


Рис. 4. Алергоблот з множинними реакціями на алергени

При роздільному аналізі CCD-позитивних пацієнтів 1-ої групи на лінійному CCD блоті було показано, що антитіла до пероксидази хрому реєструвалися достовірно вище ніж до бромелайну ($p < 0,01$), та аскорбатоксидази ($p < 0,05$). 28-ім з 38-ми обстежених пацієнтів 2-ої групи ($73,7 \pm 7,14\%$) також демонстрували позитивні реакції до різних CCD-маркерів.

Слід зазначити, що в групі пацієнтів із полісенсibiliзацією без підтвердженої наявності CCD-антитіл відзначалась така ж закономірність як і у 1-ої групи пацієнтів з підтвердженою наявністю антитіл до CCD і між групами не було достовірної різниці (рис. 5).

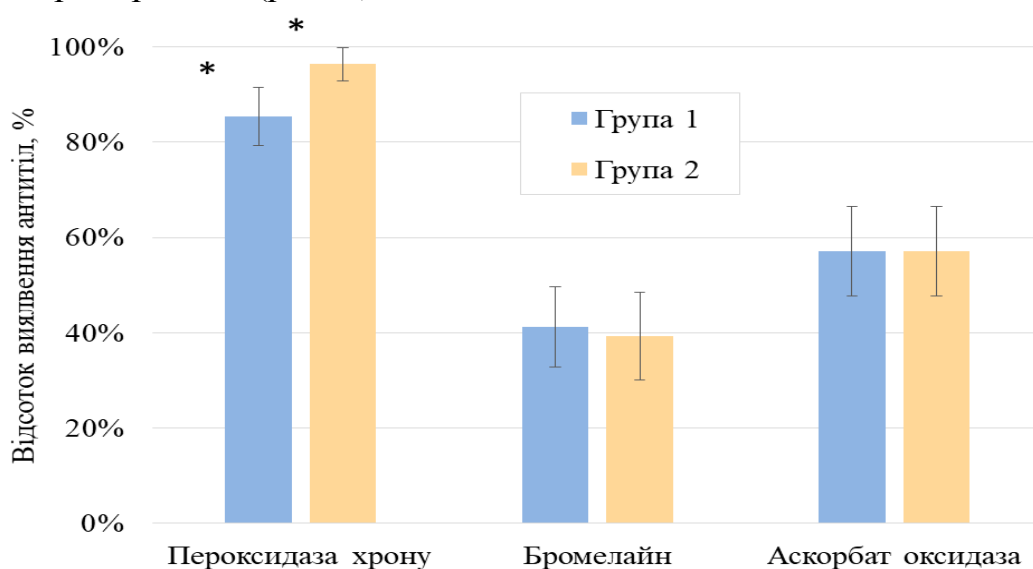


Рис. 5. Порівняльна характеристика виявлення антитіл до окремих типів CCD, $p < 0,01$

Для вивчення впливу антитіл до CCD на профілі сенсibilізації пацієнтів, та за рахунок власне яких алергенів збільшувалась кількість позитивних реакцій, було розподілено всі алергени на CCD-вмісні та такі, що не містили CCD. Отримані результати представлені на рис. 6, які наочно демонструють, що у CCD-позитивних пацієнтів достовірно ($p < 0,01$; $p < 0,05$) зростає кількість позитивних реакцій саме на алергени, у складі яких присутні бокові карбогідратні ланцюги, в той час як профіль сенсibilізації на алергени без бокових карбогідратних ланцюгів практично не відрізнявся від профілю CCD-негативних пацієнтів.

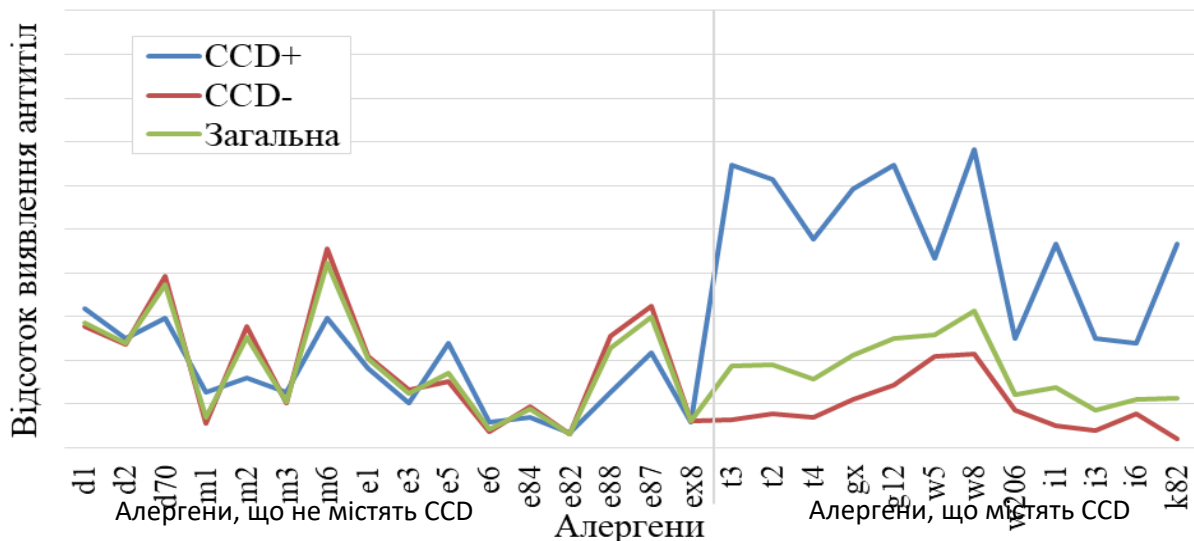


Рис. 6. Профілі сенсibilізації до різноманітних алергенів у групах CCD позитивних (CCD+) та CCD-негативних (CCD-) пацієнтів порівняно з загальними даними

З метою внутрішнього контролю було перевірено як змінюється профіль сенсibilізації у полісенсibilізованих пацієнтів (5 та більше маркерів на блоті) по відношенню до профілю пацієнтів у яких реєструвалося до 4 маркерів на блоті, як у групі CCD-негативних так і у групі CCD-позитивних пацієнтів. Таке порівняння було зумовлене тим, що саме у групах з 5 маркерами на блоті і більше значно збільшується кількість пацієнтів позитивних по відношенню до CCD маркеру.

Для цього 417 пацієнтів, що були позитивними хоча б до одного алергену були розподілені на 4 групи з огляду на наявність чи відсутність антитіл до CCD, кількість позитивних маркерів на одному блоті у кожного пацієнта (1-4 або 5 і більше маркерів) та природи антигенів (алергени, що містять CCD, та ті, що не містять): група А – CCD+ пацієнти/алергени, що не містять CCD; група В – CCD+ пацієнти/алергени, що містять CCD; група С – CCD- пацієнти/алергени, що не містять CCD; група D – CCD- пацієнти/алергени, що містять CCD (рис. 7).

При порівнянні відсотків виявлення антитіл у пацієнтів з 1-4 позитивними маркерами на блоті та у полісенсibilізованих пацієнтів (5 маркерів та більше) і обрахуванні різниці між ними у кожній групі встановлено, що рівень зростання виявлення антитіл у групах А та В становив в середньому $13,3\% \pm 1,9\%$ та $47,4\% \pm 4,5\%$, у групах С та D відповідно $21,3\% \pm 2,4\%$ та $17,0\% \pm 2,4\%$.

Зростання в групі В, було достовірно вище порівняно з групами А та D ($p < 0,01$). Варто зауважити, що зростання відсотку виявлення антитіл до алергенів, які не мають в структурі CCD-ланцюгів, було достовірно вищим у пацієнтів без антитіл до бокових карбогідратних детермінант (група С), ніж у CCD-позитивних пацієнтів. Серед CCD-негативних пацієнтів зростання частоти виявлення антитіл не відрізнялося між CCD-вмісними алергенами та такими, що не містять CCD (групи С та D).

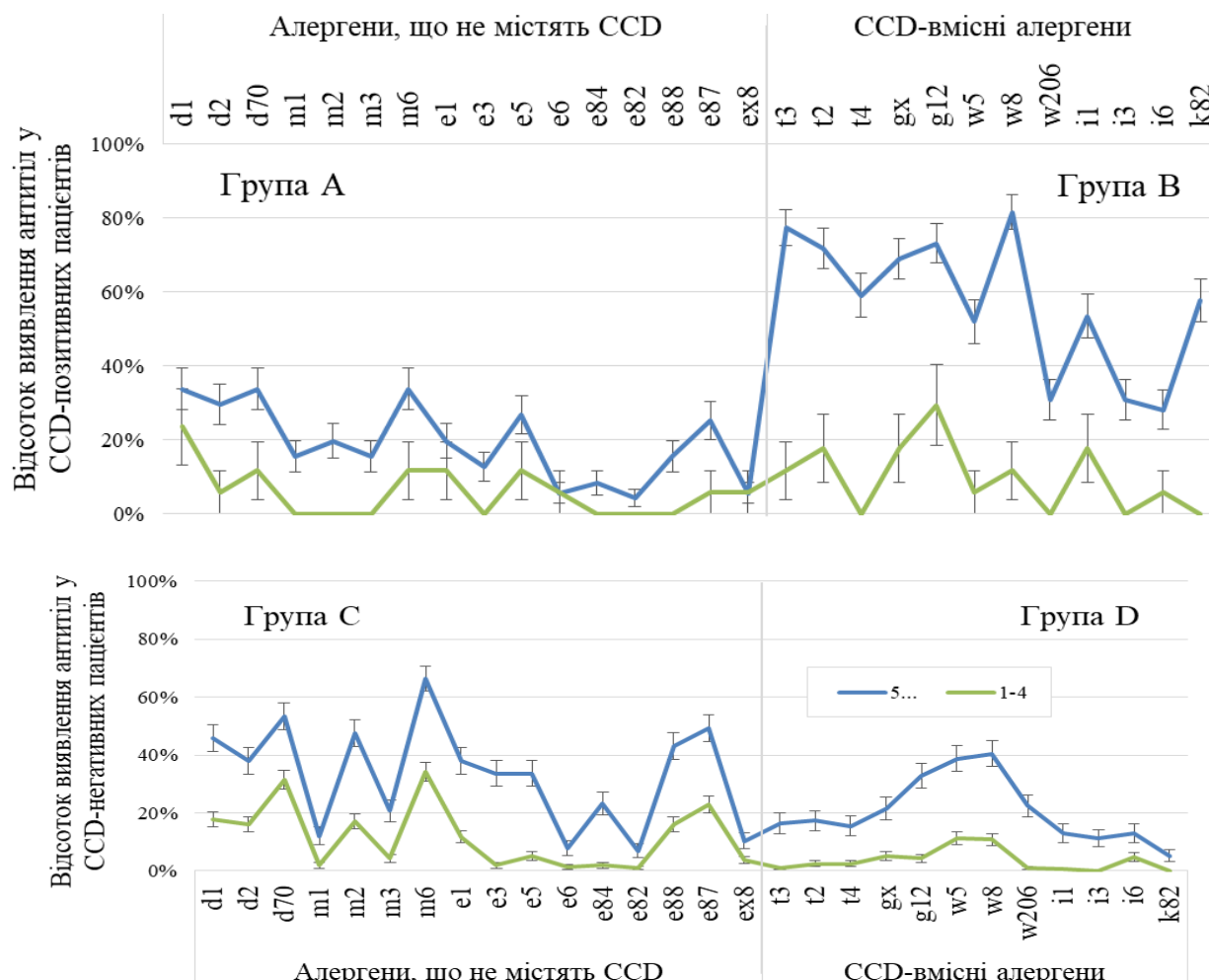


Рис. 7. Порівняльна характеристика профілів сенсibilізації між групами з 5 маркерами і більше та групами пацієнтів до 4 маркерів на блоті у CCD-позитивних (CCD+) і CCD-негативних (CCD-) пацієнтів

У полісенсibilізованих CCD-позитивних пацієнтів реєструвалося зростання відсотку позитивних реакцій в основному до CCD-вмісних алергенів, в той час як у CCD-негативних пацієнтів відзначалось рівномірне зростання відсотку позитивних реакцій до всіх алергенів.

Тобто, можна зробити припущення, що полісенсibilізація у пацієнтів з відсутністю антитіл до CCD могла бути зумовлена наявністю антитіл до білкових компонентів алергенів і була «істинною», в той час як у пацієнтів із наявністю антитіл до CCD полісенсibilізація залежала від перехресних реакцій на

неспецифічні бокові карбогідратні ланцюги рослинних та інсектних алергенів, а також латексу.

Зважаючи на вищевказане, ми повторно перевірили 84 полісенсibilізованих пацієнта з 10 та більше маркерами на блоті на наявність антитіл до 30 алергенів з попереднім блокуванням їх сироваток крові комерційним CCD-блокером виробництва компанії Mediwiss, Німеччина з метою усунення неспецифічних результатів, обумовлених наявністю антитіл до бокових карбогідратних ланцюгів. Порівняння отриманих даних представлено на рис. 8.

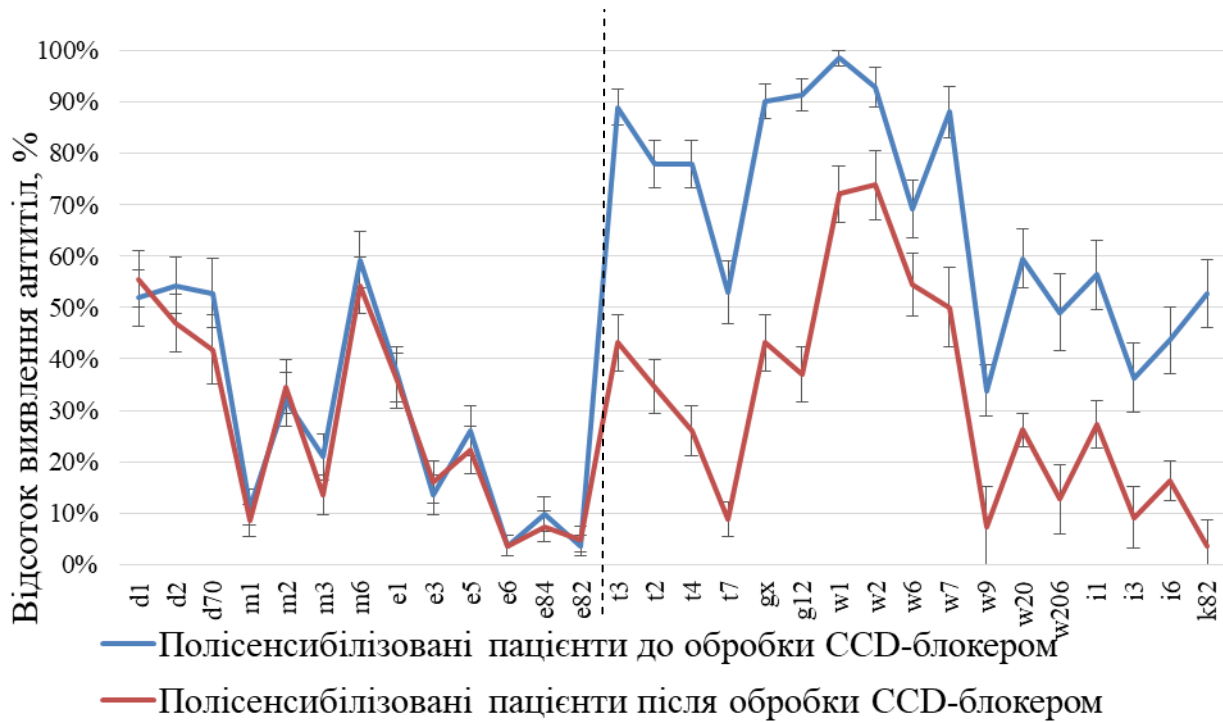


Рис. 8. Порівняння імунологічних профілів антитіл полісенсibilізованих пацієнтів до та після блокування їх сироваток крові CCD-блокером.

Показано, що після блокування було зареєстроване достовірне зниження частоти виявлення антитіл лише до CCD-вмісних алергенів ($p < 0,05$), що може свідчити про хибно позитивні результати, отриманні при первинному обстеженні у частки полісенсibilізованих пацієнтів.

Таким чином, нами було показано, що майже 1/5 частина пацієнтів демонструють антитіла до перехресно реагуючих вуглеводних детермінант, причому відсоток CCD-позитивних пацієнтів достовірно зростає з віком, а також корелює з кількістю позитивних реакцій на алергени у пацієнта (в групах з 10 маркерами і більше досягає 55%). Наявність антитіл до CCD може бути причиною хибно позитивних результатів до багатьох алергенів рослинного та інсектного походження.

Повторно обстежені 84 пацієнти, як перевірених на наявність антитіл до CCD (37 пацієнтів: 29 CCD+, 8 CCD-), так і з невідомим CCD статусом (47 пацієнтів). Після блокування сироваток CCD-блокером ми отримали наступні результати: А) на деяких блотах спостерігалось повне зникнення позитивних маркерів, що могло свідчити про відсутність антитіл до протеїнових епітопів, які

представлені на блоті (рис. 9 А); В) майже незмінні результати до та після використання CCD-блокера, що може вказувати на наявність сенсibilізації лише до протеїнових епітопів (рис. 9 В); С) часткове зникнення піків, що могло свідчити про наявність як антитіл до протеїнових так і до карбогідратних епітопів, або про високий титр антитіл до CCD, що перевищувало ємність буферу (рис. 9 С).

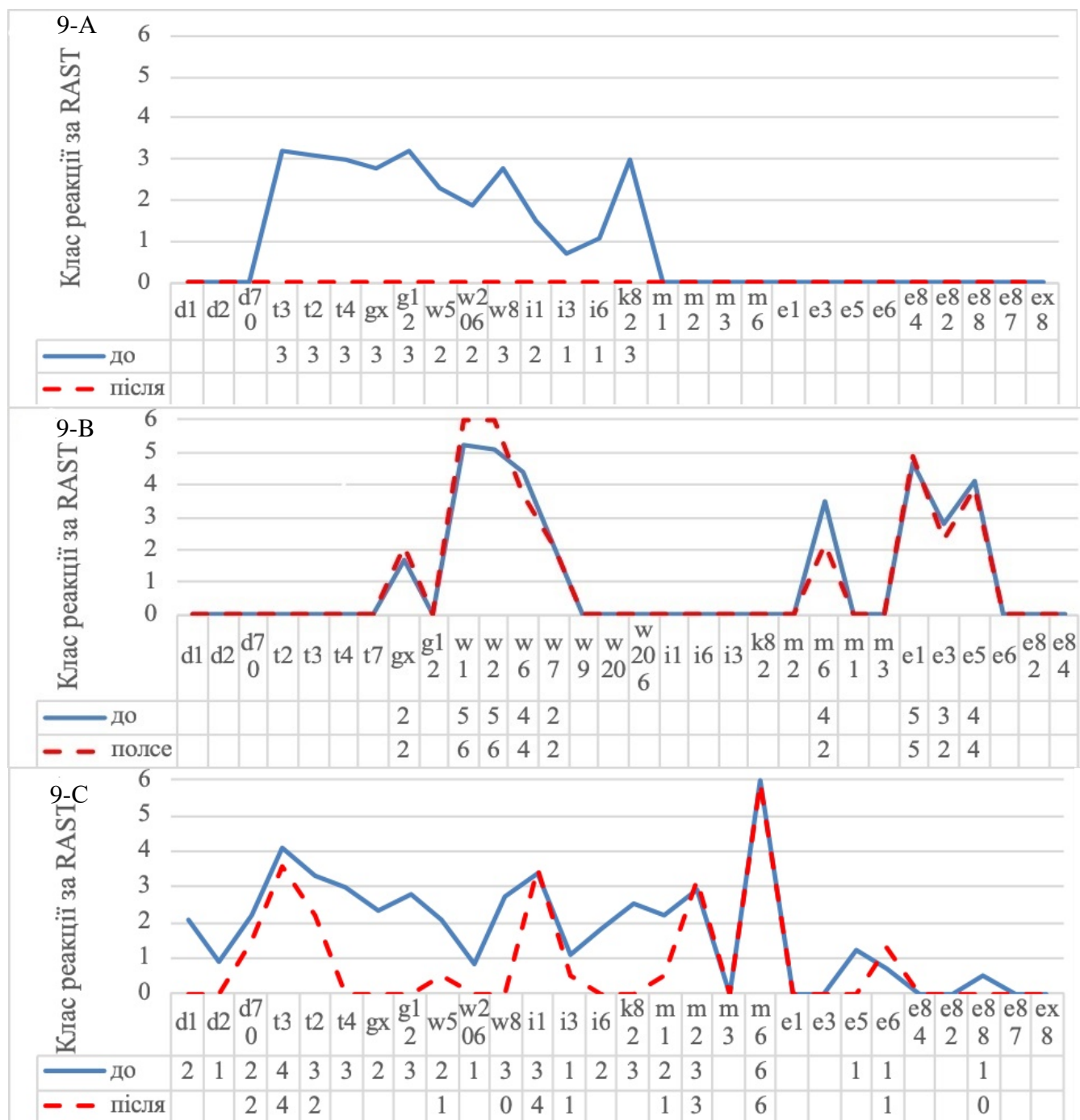


Рис. 9. Варіанти змін імунологічного профілю антитіл пацієнтів після блокування сироваток крові CCD-блокером: 9-А – повне зникнення позитивних маркерів; 9-В – незмінний профіль сенсibilізації; 9-С – часткове зникнення позитивних маркерів.

Варто зауважити, що у всіх групах пацієнтів відзначалась наступна закономірність: у пацієнтів з низьким відсотком зникнення позитивних маркерів на блоті блокування було випадковою подією, в той час як у пацієнтів із високим відсотком зникнення маркерів – закономірним процесом. Про це свідчить зменшення мінливості показників з підвищенням відсотку блокування. Так, якщо загальне зникнення маркерів було від 81 до 100%, частка рослинних алергенів, що зникали, складала в середньому 67,89%, а відхилення дорівнювало 6,5%. При цьому, якщо зникало до 20% маркерів середнє значення рослинних алергенів у групі, які зникли, теж була значною – 64,29%, але відхилення збільшувалось до 40,82%, тому що у групах із низьким відсотком загального зникнення були як незмінні результати, так і повне зникнення маркерів, в той час як зі збільшенням відсотку загального зникнення дані ставали більш однорідними.

З метою перевірки нашого припущення про причини різних варіантів змін 33 пацієнта були додатково обстежені на молекулярних блотах на наявність антитіл до двох пилкових CCD-містких алергенів – берези і тимофіївки. На блотах були присутні як екстракти алергенів, так і рекомбінантні мажорні і мінорні компоненти. Крім алергенів на кожному блоті був присутній CCD-маркер, що містив бромелайн.

Результати обстежень пацієнтів були проаналізовані окремо за двома алергенами – береза (Б) і тимофіївка (Т). У $84,2 \pm 8,4\%$ (Б) і (Т) пацієнтів з незмінними або частково змінними результатами екстрактних блотів до та після використання CCD-блокатора, визначалися антитіла до мажорних та/або мінорних компонентів. У $85,7 \pm 9,4\%$ (Б) та $86,7 \pm 8,8\%$ (Т) пацієнтів з повним зникненням позитивних маркерів на екстрактних блотах після блокування, при проведенні компонентної діагностики були відсутні антитіла до мажорних і мінорних білків.

Наші дані показали, що прогностична цінність відсутності ефекту блокування досягає 91,9%, тобто, при незмінному класі реакції після блокування сироватки CCD-блокатором із ймовірністю 91,9% не буде виявлено антитіл до компонентів алергенів. Прогностична цінність повного зникнення маркера після блокування 86,2%, тобто у цього відсотка пацієнтів не будуть виявлятися антитіла до рекомбінантних алергенів.

На підставі отриманих результатів для оптимізації діагностичного алгоритму у пацієнтів з полісенсibiliзацією та для подальшого призначення адекватної молекулярної діагностики рекомендується наступний алгоритм:

1. Проведення серологічного обстеження на лінійному алергоблоті з екстрактними алергенами.
2. При виявленні більше 5 позитивних маркерів на блоті повторне обстеження на лінійному алергоблоті з використанням CCD-блокатора.
3. При відсутності блокування позитивних маркерів рекомендована молекулярна алергодіагностика, при блокуванні – молекулярна діагностика недоцільна.

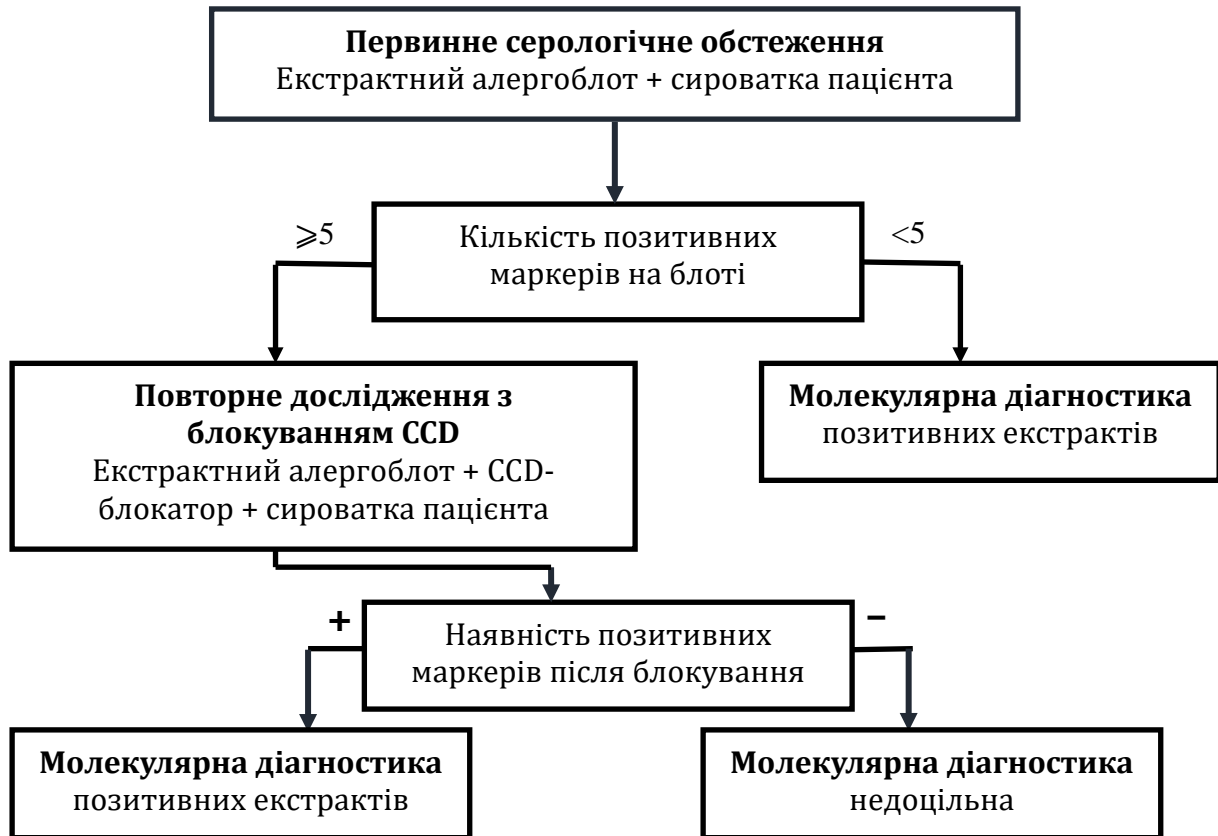


Рис. 10. Алгоритм серологічного обстеження пацієнтів з полісенсibiliзацією.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне обґрунтування та запропоноване нове вирішення актуального наукового завдання імунології та алергології – оптимізації алгоритму серологічної діагностики алергійних захворювань у пацієнтів з полісенсibiliзацією.

1) Проведене масштабне дослідження профілів сенсibiliзації до 35 респіраторних та 30 харчових алергенів у 4596 пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом з виявленням спектру алергенів, які мають пріоритетне значення у Південному регіоні України. У пацієнтів, які реагували на рослини раннього цвітіння, частіше зустрічалися антитіла до кульбаби та культивованого жита ($21,4 \pm 1,8\%$ та $16,3 \pm 0,8\%$), на алергени пізнього цвітіння – до амброзії полинолистої короткої ($35,7 \pm 1,7\%$) та амброзії полинолистої ($32,8 \pm 1,1\%$). У пацієнтів, що мали сенсibiliзацію до побутових алергенів, антитіла частіше виявлялися до плісняви *Alternaria alternate* ($33,3 \pm 1,0\%$) та до кліщів *Acarus siro* ($30,6 \pm 1,3\%$). Вперше показано, що антитіла до епітелію миші та щурів реєструвалися з раннього віку на високих рівнях: $15,6 \pm 1,6\%$ та $22,4 \pm 1,8\%$ відповідно. У структурі серопозитивності до харчових алергенів найчастіше реєструвалися антитіла до коров'ячого молока $35,67 \pm 1,60\%$ ($p=0,01$). Отримані результати дозволять лікарям звужити коло пошуків причинних алергенів.

2) Серед пацієнтів з ускладненим алергологічним анамнезом у $43,0 \pm 1,06\%$ визначалось від одного до 4 позитивних маркерів на блоті, а $43,6 \pm 1,06\%$ пацієнтів мали 5 та більше позитивних маркерів.

3) Антитіла до перехресно реагуючих вуглеводних детермінант були виявлені у $17,8 \pm 1,7\%$ пацієнтів з сезонним алергічним ринітом. Відсоток виявлення антитіл до CCD достовірно збільшувався від $22,7 \pm 6,3\%$, у пацієнтів з 5-ма та більше маркерами на одному блоті ($p < 0,05$), до $54,8 \pm 0,1\%$ при визначенні 10-ти і більше ($r = 0,88$). Пацієнти з наявністю анти-CCD антитіл значно змінювали епідеміологічну картину сенсibilізації популяції за рахунок підвищення проценту позитивності до рослинних та інсектних алергенів, а також латексу. Вперше було проаналізовано вплив антитіл до CCD-вмісних харчових продуктів на епідеміологічні показники сенсibilізації до харчових алергенів. У полісенсibilізованих пацієнтів збільшення кількості позитивних маркерів на блоті відбувалося за рахунок саме CCD-вмісних харчових антигенів.

4) Найбільший відсоток блокування CCD антитіл в розрізі груп алергенів за походженням посідали рослинні алергени (близько 63%) та алергени інсектного походження і латексу (близько 28%). Встановлено, якщо після використання CCD-блокеру спостерігалися незмінні позитивні результати, то антитіла до мажорних та/або мінорних компонентів визначалися у межах від $84,2 \pm 8,4\%$ до 100% випадків (береза та тимофіївка відповідно). Навпаки, у разі повного зникнення позитивного результату після блокування CCD антитіла до мажорних чи мінорних компонентів алергенів не визначалися у $86,2 \pm 9,1\%$ випадків.

5) Обґрунтована та оптимізована тактика серологічної діагностики алергічних захворювань: пацієнти з 5 та більше позитивними реакціями на блоті потребують повторного обстеження з використанням CCD блокеру, що дозволить подолати проблему полісенсibilізації, яка обумовлена антитілами до бокових карбогідратних ланцюгів та оптимізувати необхідність використання молекулярної діагностики для призначення раціональної специфічної імунотерапії.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

При серологічному обстеженні пацієнтів Південного регіону України рекомендовано обов'язкове включення в дослідження: з рослин раннього цвітіння – кульбаби та культивованого жита; з рослин пізнього цвітіння – амброзії полинолистої короткої та амброзії полинолистої; з побутових алергенів – плісняви *Alternaria alternate* та кліща *Acarus siro*. Доцільно включати до обстеження алергени миші та щурів у зв'язку з високим рівнем виявлення антитіл до них у дітей раннього віку. Серед харчових алергенів обов'язковим є обстеження на коров'яче молоко, білок яйця, суміші сирів, пшеничне та кукурудзяне борошно. З метою звуження кола пошуків причинних алергенів при обстеженні хворих різних вікових груп доцільно включати ключові алергени.

У пацієнтів з полісенсibilізацією рекомендовано використання наступного алгоритму серологічної діагностики алергічних захворювань:

1. З метою усунення неспецифічних реакцій, обумовлених наявністю анти-CCD антитіл, пацієнти з 5 та більше позитивними реакціями на блоті потребують повторного обстеження з використанням CCD блокеру для виявлення істинної сенсibiliзації.
2. При повному блокуванні позитивних реакцій – проведення молекулярної діагностики не рекомендовано.
3. При відсутності блокування – призначення компонентної алергодіагностики є рекомендованим і доцільним.

Наукові праці у наукових фахових виданнях України:

1. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Боровик А.П., Тарасов Є.В. Вивчення профілю сенсibiliзації до інгаляційних алергенів у пацієнтів Південного регіону України. *Досягнення біології та медицини*. 2017. Т. 2(30). С. 45-49. (Дисертантом сформовано групи обстеження, аналіз літератури, написання статті).

2. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Боровик А.П., Тарасов Є.В. Епідеміологічні аспекти CCD-позитивності у пацієнтів з клінічними проявами алергії у Південно-Західному регіоні України. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2018. Т. 17, № 3(65). С. 56-62. (Дисертантом проведено підбір, аналіз та систематизація матеріалу).

3. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Тарасов Є.В., Боровик А.П. Вивчення впливу антитіл до бокових карбогідратних ланцюгів алергенів (CCD) на популяційний профіль сенсibiliзації пацієнтів у Південно-Західному регіоні України. *Одеський медичний журнал*. 2018. Т. 6(170). С. 21-26. (Дисертантом проведено аналіз літератури, проведені серологічні дослідження та формування висновків).

4. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Тарасов Є.В., Боровик А.П. Ефективність використання CCD-блокерів у пацієнтів з множинною сенсibiliзацією. *Буковинський медичний вісник*. 2018. Т. 22, № 4(88). С. 71-79. (Дисертант приймав участь у теоретичному обґрунтуванні, формулюванні задач дослідження та інтерпретації результатів).

5. **Kurtova M.M.,** Koltsova I.H., Tarasov Ye.V., Blazhevich O.O. Age-related changes of sensibilization profiles to indoor inhalation allergens in the patients of the Southern region of Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. Т. 4. Р. 48-53. (Дисертантом поставлені задачі дослідження, проведено усі серологічні дослідження, підготовка статті до друку).

Наукові праці у зарубіжних виданнях:

6. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Тарасов Є.В., Боровик А.П. Оптимизация назначения молекулярной диагностики аллергических заболеваний за счет использования CCD-блокеров. *Гродненский медицинский журнал*. 2019. Т. 17(2). С. 164-170. (Дисертантом проведено лабораторні дослідження,

систематизація матеріалу, підготовка статті до друку). Наукометрична база – Index Copernicus.

Наукові праці апробаційного характеру

(тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

7. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Боровик А.П. Виявлення антитіл до інгаляційних алергенів у пацієнтів з проявами респіраторної алергії у Південному регіоні України // Пріоритетні напрями вирішення проблем медицини : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Дніпро, 9-10 жовтня 2016 р., Дніпро. 2016. С. 36-38. *(Дисертантом проведено підбір матеріалу та написання тез).*

8. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Боровик А.П. Особливості діагностики алергійних станів у пацієнтів з множинними позитивними реакціями на алергени // Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії : матеріали міжнар. наук.-практ. конф, м. Київ, 2-3 вересня 2016 р., Київ. 2016. С. 64-65. *(Дисертантом проведено підбір, аналіз та систематизація матеріалу).*

9. **Куртова М.М.,** Кольцова І.Г., Боровик А.П. Виявлення антитіл до інгаляційних алергенів у пацієнтів з проявами респіраторної алергії протягом року у Південному регіоні України // Пріоритетні наукові напрями у медицині: від теорії до практики : матеріали міжнар. наук.-практ. конф, м. Одеса, 16 вересня 2016 р., м. Одеса. 2016. С. 55-57. *(Дисертантом сформовані групи обстеження, аналіз та систематизація матеріалу).*

10. **Куртова М.М.,** Тарасов Є.В. Використання CCD-блокерів з метою підвищення специфічності алергодіагностики // Молодь – медицини майбутнього : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 28-29 квітня 2017 р. Одеса, 2017. С. 33. *(Дисертантом проведені серологічні дослідження методом імуноблотінгу).*

11. **Куртова М.М.,** Тарасов Є.В. Обґрунтування доцільності використання CCD-блокерів у пацієнтів з респіраторною алергією та множинною сенсibilізацією // Innovative technology in medicine: experience of Poland and Ukraine: International research and practice conference. м. Люблін, Польща, 28-29.04.2017 р., м. Люблін, 2017. С. 44-47. *(Дисертантом відібрані пацієнти з множинними реакціями та проведені серологічні дослідження методом імуноблотінгу).*

12. **Куртова М.М.** Кудря Д.В. Аналіз актуальних алергенів на Півдні України у хворих з респіраторною алергією // Молодь – медицини майбутнього : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 28-29 квітня 2016 р. Одеса, 2017. С. 39. *(Дисертантом сформовано основну ідею та проведені серологічні дослідження методом імуноблотінгу).*

13. Блажевич О. О., **Куртова М.М.,** Тарасов Є.В. Спектр алергенів, які мають пріоритетне значення у пацієнтів з респіраторною алергією у Південному регіоні України // Молодь – медицини майбутнього : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 19-20 квітня 2018 р. Одеса, 2018. С. 36. *(Дисертантом сформовано групи обстеження та підготовка тез до друку).*

14. Кудря Д.В., **Куртова М.М.,** Тарасов Є.В. Порівняльна характеристика тест-систем для діагностики алергійних захворювань // Молодь – медицини майбутнього : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 19-20 квітня 2018 р.

Одеса, 2018. С. 37. *(Дисертантом сформовано основну ідею та проведені серологічні дослідження).*

15. Блажевич О.О., Куртова М.М., Тарасов Є.В. Профіль сенсibilізації до харчових алергенів у Південному регіоні України // Молодь – медицини майбутнього : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 18-19 квітня 2019 р. Одеса, 2019. С. 34. *(Дисертантом проведено аналіз літератури та проведені серологічні дослідження).*

АНОТАЦІЯ

Куртова М.М. Оптимізація алгоритму серологічної діагностики алергійних захворювань у пацієнтів з полісенсibilізацією. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2020.

Дисертацію присвячено питанням оптимізації алгоритму серологічної діагностики алергічних захворювань у пацієнтів з полісенсibilізацією для призначення адекватної специфічної імунотерапії.

На базі обстеження 4596 пацієнтів з респіраторною та харчовою алергією виявлено спектр алергенів, які мають пріоритетне значення у Південному регіоні України.

Визначено епідеміологічні аспекти CCD-позитивності та вплив антитіл до бокових карбогідратних ланцюгів алергенів (CCD) на популяційний профіль сенсibilізації пацієнтів з алергічними захворюваннями та виявлено кореляційний зв'язок між кількістю позитивних реакцій на досліджувані алергени та відсотком пацієнтів, які реагували позитивно на CCD-маркер. Встановлено, що пацієнти з наявністю анти-CCD антитіл значно змінюють епідеміологічну картину сенсibilізації в популяції за рахунок підвищення проценту позитивності до рослинних та інсектних алергенів, а також латексу. Обґрунтована доцільність використання CCD-блокерів у пацієнтів з полісенсibilізацією для оптимізації алгоритму серологічного обстеження таких пацієнтів.

На базі використання CCD-блокерів запропонований алгоритм обстеження та подальшого призначення молекулярної діагностики.

Ключові слова: CCD, алергени, алергічні захворювання, полісенсibilізація, серологічна діагностика.

АННОТАЦИЯ

Куртова М.Н. Оптимизация алгоритма серологической диагностики аллергических заболеваний у пациентов с полисенсibilизацией. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.08 – иммунология и аллергология. – Харьковский

национальный университет имени В.Н. Каразина Министерства образования и науки Украины, Харьков, 2020.

Диссертация посвящена вопросам оптимизации алгоритма серологической диагностики аллергических заболеваний у пациентов с полисенситизацией для назначения адекватной специфической иммунотерапии.

На базе обследования 4596 пациентов с респираторной и пищевой аллергией обнаружен спектр аллергенов, которые имеют приоритетное значение в Южном регионе Украины.

Определены эпидемиологические аспекты CCD-позитивности и влияние антител к боковым карбогидратным цепям аллергенов (CCD) на популяционный профиль сенситизации пациентов с аллергическими заболеваниями и выявлена корреляционная связь между количеством положительных реакций на исследуемые аллергены и процентом пациентов, которые реагировали положительно на CCD-маркер. Установлено, что пациенты с наличием анти-CCD антител значительно изменяют эпидемиологическую картину сенситизации в популяции за счет повышения процента позитивности растительных и инсектных аллергенов, а также латекса. Обоснована целесообразность использования CCD-блокеров у пациентов с полисенситизацией для оптимизации алгоритма серологического обследования таких пациентов.

На базе использования CCD-блокеров предложены критерии для дальнейшего назначения молекулярной диагностики.

Ключевые слова: CCD, аллергены, аллергические заболевания, полисенситизация, серологическая диагностика.

ABSTRACT

Kurtova M.M. Optimization of the algorithm for serological diagnosis of allergic diseases in patients with polysensitization. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Medicine: Specialty 14.03.08 – Immunology and allergology (Medical Sciences) – V.N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine. – Kharkiv, 2020.

The dissertation is devoted to optimization of the algorithm of serological diagnosis of allergic diseases in polysensitized patients for the prescription of adequate specific immunotherapy.

A survey of 4596 patients with respiratory and food allergies showed a range of allergens that are of high priority in the Southern region of Ukraine. Patients were examined for antibodies to outdoor, indoor and food allergens, as well as insects venom. Among early flowering plants it was more common detection of antibodies to dandelion and cultured rye, among late-flowering plants - to short ragweed and common ragweed. Among allergens causing allergy during the year, more frequently it was found antibodies to *Alternaria alternate* mould has and to tick *Acarus siro*. Among food allergens more frequently antibodies were detected to cow's milk and egg white, and it is corresponded to worldwide data.

The dynamics of age-related changes in sensitization to respiratory and food allergens were analyzed. Our study showed that antibodies to mouse and rat epithelium were detected in early age in high levels in the southern region of Ukraine. The percentage of polysensitized persons among patients with different allergy disease was determined. Based on our data, major target allergens may be suggested for the examination of patients of all ages with respiratory and food allergies.

But at the stage of serological examination there is a problem of false-positive reactions, which may be due to the presence of antibodies to cross-reactive carbohydrate determinants (CCD).

The epidemiological aspects of CCD-positivity and the influence of antibodies to the carbohydrate determinants on the population profile of sensitization of patients with allergic diseases were determined. Correlation between the number of positive reactions to the tested allergens and the percentage of patients positively reacted on CCD marker was found. The percentage of detection of antibodies to CCD was significantly increased in patients with 5 or more allergens markers on the blot. Polysensitized CCD-positive patients were recorded an increase in the percentage of positive reactions mainly to CCD-containing allergens, while CCD-negative patients we're reported increase in the percentage of positive reactions to all allergens. Patients with anti-CCD antibodies significantly change the epidemiological pattern of sensitization in the population by increasing the percentage of positivity to plant and insect allergens and latex.

To determine the presence of antibodies to CCD markers separately - bromelain, horseradish peroxidase, or oxidase ascorbate - a linear CCD blot with split CCD chains was proposed. During separate analysis of CCD-positive patients on linear CCD blots, it was shown that the level of antibodies to horseradish peroxidase was significantly higher than those to bromelain and oxidase ascorbate.

For the first time in Ukraine, the impact of antibodies to CCD on the pattern of sensitization to food allergens was analyzed.

For avoiding influence of CCD antibodies on profiles of sensitization CCD-blocker can be used. The patterns of results after using a CCD blocker differed for each patient and depended on individual sensitization: some blots showed complete disappearance of positive markers, which could indicate the absence of antibodies to the protein epitopes presented on the blot; almost unchanged results before and after using the CCD blocker, which may indicate sensitization only to protein epitopes; partial disappearance of peaks, which could indicate the presence of both antibodies to protein and carbohydrate epitopes. In order to understand, specifically to which part of the allergen the antibodies were attached, patients was tested on molecular immunoblotings on two CCD-containing allergens (birch and timothy). Patients who showed consistent positive results before and after using the CCD blocker on extract blots were positive for antibodies to major and / or minor components as birch as timothy. In patients who showed complete disappearance of positive markers on extract blots after blocking, antibodies to major and minor proteins were absent during component diagnosis in both allergens.

For the optimization of serological examination of polysensitized patients, the algorithm based on the using of CCD-blockers was substantiated: patients with 5 or more positive reactions on the blot need re-examination with CCD blocker, which will overcome the problem of multiple sensitization caused by antibodies to the cross-reactive carbohydrate chains and optimized prescription of molecular diagnostics for the rational specific immunotherapy

Key words: allergens, allergic diseases, CCD, polysensitization, serological reaction.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CCD – cross-reactive carbohydrate determinants

D. farinae – кліщ домашнього пилу *Dermatophagoides farinae*

D. pteronyssinus – кліщ домашнього пилу *Dermatophagoides pteronyssinus*

EAACI – European Academy of Allergy and Clinical Immunology

IgE – імуноглобуліни класу E

ISAAC – International Study of Astma and Allergies in Childhood

RAST – radioallergosorbent test

sIgE – специфічний імуноглобулін класу E